

本操作手册适用于离心法从140ul 血清、血浆、尿液、细胞培养上清液、无细胞体液、拭子浸液中纯化病毒RNA。如需配合QIAcube核酸纯化工作站实现自动化病毒RNA纯化，请参阅QIAcube操作说明。如处理更大量的样本（可多至560ul），按照标准操作流程增加适当比例的裂解液以及载样次数即可。针对一些病毒含量很低的样本，可参照附录中样本浓缩操作步骤对样本进行浓缩。

注意事项：

- 1、所有步骤均于室温下操作(15–25℃)。
- 2、样本收集和离心后，血浆（未经处理，或用肝素之外的抗凝剂处理）或血清可在2–8℃下储存至多6个小时。如需长期保存，推荐分装后在–20℃ 或 –80℃ 保存。冷冻血浆或血清**样本不可反复冻融**。反复冻融将会促使蛋白变性沉淀，因而病毒含量降低，导致纯化得到的病毒RNA的量减少。并且，反复冻融形成的冷凝蛋白将有可能导致QIAamp膜堵塞。冷凝蛋白可通过 6800 x g 下快速离心3 分钟去除，小心吸取上清后立即进行下一步操作。这一步骤不会影响病毒的含量。
- 3、本操作步骤不适用于RNA和DNA分离，**样本中存在的DNA和RNA会被同时纯化出来**。如需完全去除DNA的影响，推荐使用无细胞体液作为病毒RNA纯化的起始样本。含有细胞的样本，例如脑脊液、骨髓、尿液、以及大部分拭子，首先需要过滤，或者1500 x g离心10分钟以上取上清使用。如DNA和RNA已经一并完成纯化，可将洗脱液经过无RNA酶的DNA酶消化处理，接着热处理将DNA酶灭活。
- 4、可以纯化所有**大于200nt的RNA分子**，小分子RNA将不能得到高效率的纯化。

本操作手册仅限内部学习使用！如有任何疑问，请联系：胡川（18918373075）

准备事项:

- 1、 所有样本平衡至室温
- 2、 **Buffer AVE**平衡至室温
- 3、 每个样本提供4个2ml收集管,根据不同需要适当自备无RNA酶超净2ml收集管/1.5ml离心管
- 4、 按照下面的配方准备AW1 和AW2 Buffer

Buffer AW1

以浓缩液的形式提供。使用前,按照Table 2的配比,加入特定量的乙醇(96–100%)至瓶身的指示线。该Buffer可在室温下(15–25℃)密闭保存1年,直至试剂的保质期。

Table 2. Preparation of Buffer AW1

Kit cat. no.	No. of preps	AW1 concentrate	Ethanol	Final volume
52904	50	19 ml	25 ml	44 ml
52906	250	98 ml	130 ml	228 ml

Buffer AW2

以浓缩液的形式提供。使用前,按照Table 2的配比,加入特定量的乙醇(96–100%)至瓶身的指示线。该Buffer可在室温下(15–25℃)密闭保存1年,直至试剂的保质期。

Table 3. Preparation of Buffer AW2

Kit cat. no.	No. of preps	AW2 concentrate	Ethanol	Final volume
52904	50	13 ml	30 ml	43 ml
52906	250	66 ml	160 ml	226 ml

- 5、 按照下列说明将carrier RNA 加至 **Buffer AVE** 及 **Buffer AVL** :

加310 µl Buffer AVE至装有310 µg Carrier RNA冻干粉的管中,将Carrier RNA彻底溶解,得到终浓度为1 µg/µl的Carrier RNA-AVE溶液,分装后-20℃储存。不要反复冻融超过3次。

操作前检查Buffer AVL 是否沉淀,如有必要可在 80℃ 孵育直至沉淀溶解。按照实际处理的样本数来配置Buffer AVL和Carrier RNA-AVE的混合液。混匀时,反复轻柔倒置管子10次即可,为了避免泡沫产生,切勿涡旋震荡。为了安全,请佩戴手套操作。



QIAamp® Viral RNA Mini Kit(52904/52906)

如需提取大量样品，可根据以下公式计算：

$$n \times 0.56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10 \text{ } \mu\text{l/ml} = z \text{ } \mu\text{l}$$

n=同时提取样品个数， y=需要加入Buffer AVL体积， z=需要加入Carrier RNA-AVE体积

Table 1. Volumes of Buffer AVL and carrier RNA-Buffer AVE mix required for the QIAamp Viral RNA Mini procedure

No. samples	Vol. Buffer AVL (ml)	Vol. carrier RNA-AVE (μl)	No. samples	Vol. Buffer AVL (ml)	Vol. carrier RNA-AVE (μl)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.40	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

注意：

Buffer AVL-carrier RNA 需新鲜配置，该Buffer 可在2-8℃ 下可保存至多48小时。该溶液如在2-8℃ 下保存时产生沉淀，需在80℃ 下加热溶解后使用。不要反复加热Buffer

AVL-carrier RNA超过6次。每次孵育不要超过5分钟。频繁的加热和长时间的孵育会导致carrier RNA的降解，以及病毒RNA的量减少，最后导致定量RT-PCR检测失败。尤其会影响到低含量病毒的检测。

操作步骤:

- 1、吸取**560ul** 准备好的**Buffer AVL-carrier RNA** 至**1.5ml** 的离心管（未提供）。
如果样本量大于**140ul**，则需相应增加**Buffer AVL-carrier RNA** 的量（例如，**280ul** 样本需要**1120ul Buffer AVL-carrier RNA**），且需使用相应容量的管子。
- 2、加**140 µl** 血浆、血清、尿液、细胞培养上清液，或其他无细胞体液至第1步准备好的管中。**涡旋振荡15秒**。为了保证裂解效率，请确保样本与**Buffer AVL**彻底混匀为匀浆。只冻融过1次的冰冻样本也可被处理。

如样本是拭子，请按照以下步骤处理：
 - 拭子置于离心管中，加入**400ul Buffer ATL**浸润样本
 - **56℃** 振荡孵育**15 min**
 - 吸取**140 µl**样本加入第1步准备好的离心管
- 3、室温下(**15–25℃**)孵育**10分钟**。
病毒颗粒在室温下**10分钟**后充分裂解。长时间的孵育无助于RNA的产量和质量。潜在的污染源和RNA酶在**Buffer AVL**中呈失活状态。
- 4、快速离心以去除附着于内壁与内盖的水滴。
- 5、加**560 µl乙醇(96–100%)**至样本中，短暂离心**15秒**混匀。混匀后，快速离心去除附着于内壁与内盖的水滴。
只有高纯度乙醇可以使用，因为其他酒精类溶液会降低RNA的产量和质量。不要使用变性的酒精，里面含有甲醇、甲酮类物质。如果样本量大于**140ul**，需相应比例地增加乙醇的用量（例如，**280ul**的样本需要**1120ul**的乙醇）。为了确保结合效率，必须确保样本与乙醇彻底混匀为匀浆。
- 6、小心吸取**630ul**第5步获得的溶液至**QIAamp Mini column**上（柱子放置于1个**2毫升**的收集管内），小心不要碰到柱子的边缘。盖上盖子，**6000 x g (8000 rpm)**下离心**1分钟**。将**QIAamp Mini column**移至1个新的**2ml**收集管，丢弃带有流出液的旧管。盖上每个柱子的盖子有助于避免离心中的交叉污染。离心推荐程序：**6000 x g (8000 rpm)**下离心**1分钟**，离心机产生的噪音较小。全速离心不会影响病毒RNA的产量和质量。如果离心后膜上仍有残留液体，可以更高速度离心一次，直至膜上无残留液体。
- 7、小心打开盖子，重复第6步操作。
如果样本的起始量大于**140ul**，重复此步骤直至所有的裂解液都上载到柱子上。
- 8、小心打开盖子，加入**500ul Buffer AW1**。盖上盖子，**6000 x g (8000 rpm)**下离心**1分钟**。将**QIAamp Mini column**移至1个新的**2ml**收集管，丢弃带有流出液的旧管。即使起始量大于**140ul**，也不需要增加**Buffer AW1**的量。

- 9、 小心打开盖子，加入500ul Buffer AW2。盖上盖子全速离心(20,000 x g; 14,000 rpm) 3分钟。直接进行第11步，或为了排除Buffer AW2的残留机会，先进行第10步操作，再做第11步。

Buffer AW2残留至洗脱液将会对下游检测产生影响。有些离心机在减速的时候会震动，从而导致含有Buffer AW2 的流出液接触到柱子。或者从离心机里将带着柱子的收集管取出的时候，也有机会让流出液碰到柱子。在此情况下，需要进行第10步的操作。

- 10、 **推荐：**将柱子放在一个新的2ml收集管（未提供），丢到含有流出液的旧管。全速离心1分钟。

- 11、 将柱子放在1个干净的1.5ml的离心管（未提供），丢掉含有流出液的旧管。小心打开盖子，加60ul 平衡好的Buffer AVE至膜上。盖上盖子，室温下孵育1分钟。6000 x g (8000 rpm)离心1分钟。

单次60ul Buffer AVE处理QIAamp Mini column可以达到至少90%的病毒RNA洗提效率。2次40ul Buffer AVE洗提可以提高10%的产量。洗提体积小于30ul会减少产量，也不会增加最终洗提液中RNA的浓度。病毒RNA在-20℃ 或-70℃ 下可以稳定保存至多1年。



QIAamp® Viral RNA Mini Kit(52904/52906)

附录1：样本浓缩

血浆、血清、尿液、脑脊液、骨髓和其他无细胞体液常常含有很低量的病毒。因此，推荐将至多3.5ml的样本浓缩至140ul。

注意事项：

离心机，例如离心法的微量浓缩产品（Centricon® 100 (Amicon: 2 ml, cat. no. 4211)，Microsep 100 (Filtron: 3.5 ml, cat. no. OD100C40)，Ultrafree® CL (Millipore: 2 ml, cat. no. UFC4 THK 25)等）

操作步骤：

- A、 根据说明书，加至多3.5ml 样本至上面提到的微量浓缩产品上
- B、 按照说明书，将样本离心至最终样本体积至140ul
一些样本，特别是血浆，因为很粘稠，可能很难离心至140ul。可能需要离心多达6个小时。
- C、 吸取140ul 浓缩好的样本，加到1.5ml的离心管里，参照第1步来操作。

附录2 试剂盒组分表：

Kit Contents

QIAamp Viral RNA Kit	(50)	(250)
Catalog no.	52904	52906
Number of preps	50	250
QIAamp Mini Spin Columns	50	250
Collection Tubes (2 ml)	200	1000
Buffer AVL*	31 ml	5 x 31 ml
Buffer AW1* (concentrate)	19 ml	98 ml
Buffer AW2† (concentrate)	13 ml	66 ml
Buffer AVE†	3 x 2 ml	10 x 2 ml
Carrier RNA (poly A)	310 µg	5 x 310 µg
Selection Guide	1	1

* Contains chaotropic salt which is an irritant. Not compatible with disinfecting reagents that contain bleach. See page 5 for safety information.

† Contains sodium azide as a preservative.

注意：试剂盒常温运输保存（15–25℃）1年。配成溶液的Carrier RNA-AVE，分装后-20℃储存。Buffer AVL–carrier RNA 需新鲜配置，该Buffer 可在2–8℃ 下可保存至多48小时。